

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Modifications enzymatiques liées au vieillissement des cellules en culture

Houben, Anne

Award date:
1976

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

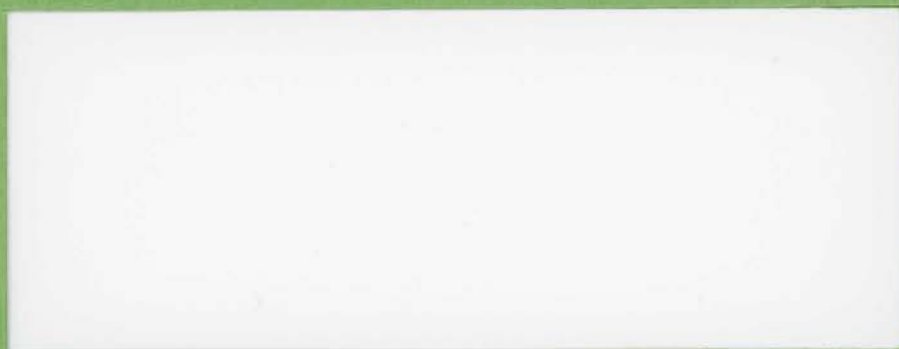
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX.

NAMUR

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par



/1976/

FACULTES
UNIVERSITAIRES
N.-D. DE LA PAIX
NAMUR

Bibliothèque

FMB4/

1976/5

1975 - 1976

Département chimie - physiologie

MODIFICATIONS ENZYMATIQUES
LIEES AU VIEILLISSEMENT
DES CELLULES EN CULTURE

FTB 4 / 1976/5

Anne HOUBEN

2e licence zoologie



204820
LBS 3410984

Que Monsieur le Professeur Remacle qui a accepté de patronner ce mémoire, qui m'a guidée et encouragée tout au long de sa réalisation trouve ici l'expression de ma très-vive reconnaissance.

Mes remerciements les plus sincères vont également à Madame Houbion dont l'aide au laboratoire me fut indispensable;

à Mademoiselle Peters qui m'a initiée aux techniques biochimiques;

à Monsieur Dubois pour sa constante disponibilité;

à Monsieur le docteur Wattiaux qui m'a aimablement accueillie dans son département dont je voudrais aussi remercier tous les membres pour leur sympathie et leurs encouragements;

à la Fondation Interuniversitaire pour l'étude des processus de vieillissement qui nous a accordé l'aide financière nécessaire à notre recherche.

P L A N

- I. INTRODUCTION
- II. TECHNIQUES DE CULTURE DES CELLULES HUMAINES
 1. Milieu de culture, pH, sérum
 2. Problème du verre
 3. Le repiquage
 - a) Préparatifs
 - b) Trypsinisation
 4. La congélation et la décongélation
 5. Contamination et stérilisation
 - a) La hotte à flux laminaire
 - b) Stérilisation à sec
 - c) Stérilisation à l'autoclave
 - d) Les filtres
 - e) Stérilisation du milieu
 - f) Précautions diverses
 6. Origine des cellules utilisées
- III. DOSAGE ENZYMATIQUE
 1. Caractéristiques des enzymes
 - a) l' α -glucosidase
 - b) la N-acétyl - β - glucosaminidase
 2. Substrats utilisés pour le dosage
 3. Préparation de l'homogénat de cellules
 4. Dosage proprement dit
 - a) Courbe de pH
 - b) Cinétique des deux enzymes
 5. Inactivation de la N-acétyl - β - glucosaminidase A et courbes de température

IV. THERMOLABILITE DES ENZYMES AU COURS DU VIEILLISSEMENT
DES CELLULES

1. Comparaison de l'activité enzymatique au cours du
vieillissement
2. Expérience proprement dite

V. DISCUSSION

I. INTRODUCTION

Les expériences d'Hayflick et Moorhead (6) ont montré que les cellules diploïdes provenant de fœtus humain ont une vie limitée lorsqu'elles sont cultivées in vitro.

Ces observations s'opposaient à celles de Carrel qui avait constaté que les fibroblastes de poulet cultivés in vitro avaient une vie illimitée. D'après Hayflick (8), ces résultats étaient dus au fait que le milieu nutritif (préparé à partir d'extraits de tissu de poulet) contenait lui-même des fibroblastes; il provoquait ainsi un rajeunissement continu de la culture à chaque changement de milieu. Il est reconnu actuellement que les fibroblastes normaux (contrairement aux fibroblastes transformés) de nombreuses espèces, ne peuvent atteindre in vitro qu'un nombre de divisions limité : les fibroblastes provenant d'embryon humain se divisent 40 à 60 fois, les fibroblastes de poulet 15 à 35 fois, ceux de souris 14 à 28 fois, ceux de cheval environ 82 fois, ceux de singe 60 fois, ceux de chat 92 fois etC.. (9,24).

Ces fibroblastes possèdent trois caractéristiques (6) :

1. Ils montrent in vitro les mêmes propriétés morphologiques, physiologiques et immunologiques que les cellules normales.
2. Ils ont le caryotype des cellules du tissu d'origine, par exemple, 46 chromosomes pour les fibroblastes humains.
3. Ils ont un potentiel de multiplication limité et ne dépassent pas un certain nombre de divisions.

Ces caractéristiques s'opposent à celles des cellules transformées qui ont un caryotype souvent différent des cellules d'origine et qui peuvent être cultivées pour une période indéfinie.

Une caractéristique remarquable des fibroblastes normaux est de garder leur potentiel de division après congélation (6). Prenons le cas des fibroblastes humains qui peuvent atteindre environ 50 générations; le nombre de générations sera toujours le même quel que soit le nombre de fois que les cellules sont congelées, quels que soient la durée de la congélation et le nombre de générations que les cellules ont atteint au moment de la congélation.

Le phénomène de congélation qui perturbe profondément la cellule introduit des modifications qui ne sont pas reliées au phénomène du vieillissement.

Afin de vérifier l'influence du milieu sur le vieillissement, Hayflick et Moorhead ont mélangé des cellules vieilles et jeunes et les ont fait croître dans un même milieu. Les cellules vieilles ont arrêté de pousser rapidement et les cellules jeunes ont continué à se diviser, le nombre de générations étant le même pour les deux types de cellules. Cette expérience prouve qu'une carence éventuelle du milieu n'est pas responsable du vieillissement de ces cellules.

On peut se demander si le vieillissement cellulaire in vitro est dû au vieillissement de l'individu.

Hayflick et Moorhead (6) ont montré qu'il existe une relation entre le nombre de générations que peut atteindre les cellules et l'âge du donneur.

Plus la personne est âgée et moins les cellules pourront se diviser. Dans une même espèce animale l'expérience de laboratoire représente un aspect du vieillissement de l'individu. (1) Cette relation n'est plus vraie si l'on compare des espèces différentes : Stanley et Col. (24) ont mesuré le nombre de divisions de fibroblastes d'embryons de diverses espèces animales et comparé ce nombre avec l'âge maximum que peuvent atteindre ces animaux. On ne trouve pas de corrélation directe entre les deux phénomènes. De nombreuses restrictions doivent être introduites dans ces comparaisons, notamment le fait que l'origine des fibroblastes n'est pas nécessairement identique ou encore que la vitesse de renouvellement des fibroblastes est peut-être très différente chez les diverses espèces animales.

Lors de la culture de fibroblastres humains diploïdes, trois phases peuvent être distinguées.

a- La phase I

Les fibroblastres prélevés par des moyens enzymatiques ou mécaniques sont mis en culture. Les fibroblastres s'attachent sur la bouteille ou sur la boîte de pétri; ils croissent et se divisent pour former une couche confluyente. A ce moment les cellules s'arrêtent de pousser : c'est ce que l'on appelle l'inhibition de contact.

b- La phase II

La phase II est caractérisée par une multiplication rapide des cellules.. les cellules de la phase I formant la couche confluente à la surface de la première bouteille de culture vont être repiquées dans deux bouteilles de surface égale à la première bouteille. Les fibroblastes pourront ainsi se diviser une fois pour former de nouveau une couche confluente qui va elle-même être répartie en deux bouteilles etc.. Le temps séparant le repiquage des cellules et la confluence est de plus ou moins 48 heures en phase II (6). L'activité métabolique des cellules est très élevée durant cette période; la grande production d'acide en témoigne.

c- La phase III

La phase III correspond à la phase typique du vieillissement des cellules; elle est caractérisée par l'apparition de débris dans la culture, par la diminution de l'inhibition de contact et de l'activité mitotique. Les cellules mettent plus longtemps à atteindre la confluence (une semaine environ). Ce phénomène pourrait avoir deux causes (1) : soit l'augmentation du temps de division des cellules de la culture, soit l'apparition d'une population hétérogène de fibroblastes dont une partie perdrait sa capacité de se diviser tandis que l'autre continuerait à se diviser normalement; la diminution du nombre de cellules gardant leur potentiel de division entraînerait une augmentation du temps nécessaire à la culture pour arriver à la confluence.

La première hypothèse semble actuellement la plus vraisemblable car la proportion de cellules capables de passer par la mitose reste supérieure à 90 % jusqu'à un stade très avancé de la culture (16) Le temps de génération s'allonge très fortement avec l'évolution de la culture et devient différent d'une cellule à l'autre. Dès lors la population de cellules devient très hétérogène quant au temps de division; celui-ci devenant très long chez certaines cellules.

La diminution d'activité mitotique est suivie de la dégénération et de la mort de la culture.

- De nombreuses recherches ont été faites pour essayer de caractériser ce qui différencie les cellules de la phase III ou cellules vieilles, des cellules de la phase II ou cellules jeunes.

a- Différences morphologiques

1- Au microscope à contraste de phase, nous avons pu observer qualitativement une augmentation de la surface des cellules et du nombre de granules dans le cytoplasme.

2- Le caryotype très stable en phase I et II s'altère chez de nombreux fibroblastes en phase III avec apparition d'aneuploidie et d'aberrations chromosomiques (7).

3- Un des plus remarquables changements morphologiques souligné par Brock et Hay pour les fibroblastes de poulet et par Robbins pour les fibroblastes humains est l'augmentation de la taille des lysosomes secondaires et des corps résiduels au cours du vieillissement in vitro(1).

b- Différences biochimiques

Au point de vue biochimique, de très nombreuses expériences ont été faites afin de comparer l'activité des enzymes chez les cellules vieilles et chez les cellules jeunes.

Les résultats obtenus par les différents chercheurs concernant un même enzyme sont souvent contradictoires.

L'explication de ces différences résulte probablement des divers modes d'expression des résultats qui tiennent compte ou non des nouvelles divisions cellulaires et du fait que certaines activités enzymatiques varient fortement avec les conditions de cultures et l'état de la croissance cellulaire; ces variations sont souvent supérieures aux variations dues au vieillissement.

Afin d'éliminer au maximum ces fluctuations, Sun et Packer (25) ont entrepris une étude systématique de l'activité enzymatique au cours de la croissance cellulaire. Ils ont constaté que dans leurs conditions expérimentales, les activités retrouvaient leur valeur d'origine 7 jours après le repiquage. C'est le moment où les cellules arrivent à confluence. Ils ont choisi ces cellules comme matériel de travail. D'autre part, ils ont exprimé leurs données enzymatiques non seulement en mg de protéines mais également en millions de cellules. Ils ont suivi l'évolution de l'activité enzymatique entre le passage 20 et le passage 50 et constatent une augmentation

de 200 % de l'activité de la N- acétyl - β - glucosaminidase (marqueur des lysosomes), une augmentation de 300 % de l'activité de la 5' nucléotidase (marqueur des membranes plasmiques) et de la cytochrome oxydase (marqueur des mitochondries). Il y a peu de changements de l'activité de la catalase.

Il existe de nombreuses études enzymatiques mais qui n'ont pas suffisamment tenu compte des variations dues à la culture elle-même (2, 23, 27). Notons cependant les résultats de Wang et Col. (29) qui ont effectué leurs dosages à période constante après le repiquage. Ils ont remarqué après le 42^e passage une augmentation d'activité des transaminases (glumate pyruvate transaminase et glumate oxaloacetatetransaminase) des phosphatases (phosphatase acide, phosphatase alcaline, glucose - 6 - phosphatase) et des déshydrogénases (lactate déshydrogénase, malate déshydrogénase, isocitrate déshydrogénase et glumatate déshydrogénase).

-Un phénomène important lié au vieillissement a été mis en évidence par Holliday et Tarrant (12). Leurs travaux se situent dans la ligne de la théorie d'Orgel. Celle-ci suggère que le vieillissement est dû à des erreurs dans la séquence des protéines; ces erreurs étant dues à des substitutions au hasard d'acides aminés. Il y aurait ainsi dans les cellules vieilles un mélange de protéines normales et anormales. D'autre part on a mis en évidence que la substitution d'acides aminés dans la séquence d'un enzyme le rend plus labile à la chaleur (12). Holliday et Tarrant ont testé la sensibilité à la chaleur de la glucose -6- phosphate déshydrogénase et de la 6- phosphogluconate déshydrogénase. Il faut souligner que ces deux enzymes sont homogènes; c'est à dire qu'ils ne possèdent pas d'isoenzymes et leur activité diminue de façon exponentielle en fonction du temps au cours de l'incubation à haute température (l'inactivation de l'enzyme ne se fait pas exponentiellement lorsque celui-ci comporte plusieurs isoenzymes).

Les tests de thermolabilité ont été faits pour des cellules jeunes et pour des cellules vieilles et ont montré que l'activité des cellules jeunes diminue exponentiellement en fonction du temps; par contre la diminution de l'activité enzymatique chez des cellules vieilles est très rapide au début puis se stabilise par la suite

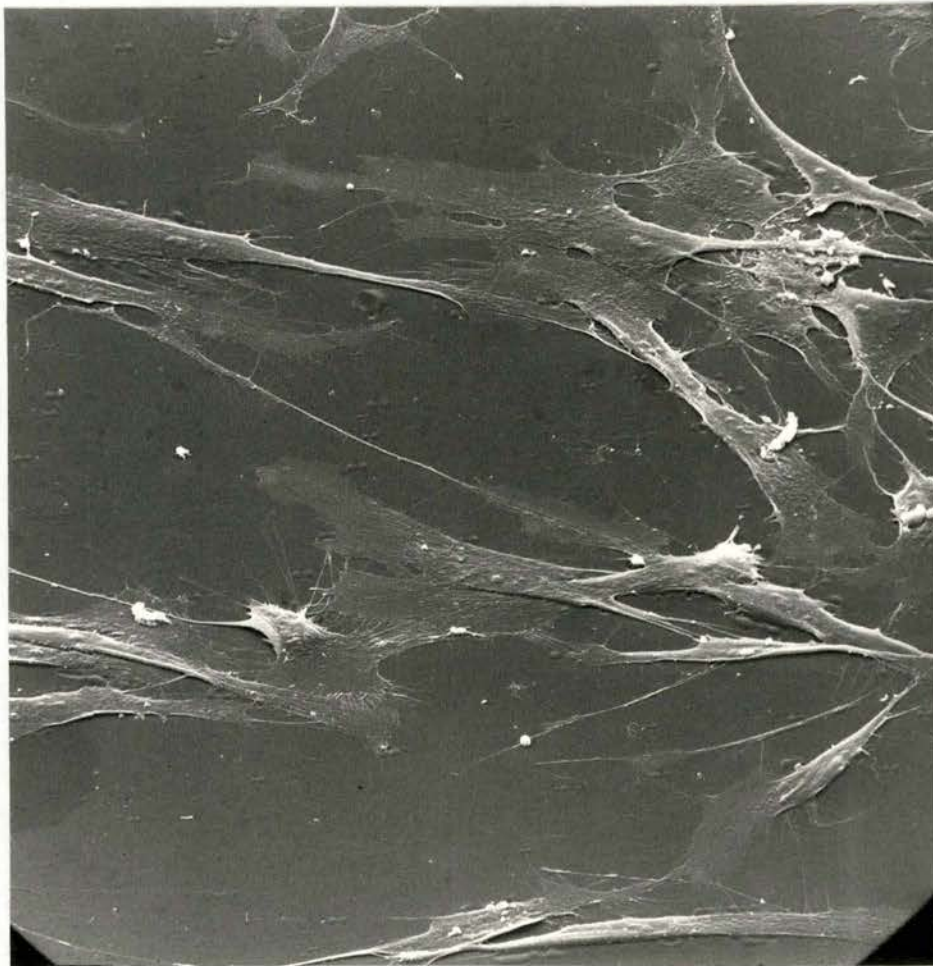


Figure 1 :

Fibroblastes humains W I 38 vus au microscope à balayage (le grossissement est de 300 fois) . La photo a été prise deux jours après la mise en culture des cellules. Celles-ci se trouvent à une densité égale à 20 % de la confluence.

à une valeur plus faible.

Ces résultats suggèrent que les deux enzymes qui se comportent de façon homogène chez les cellules jeunes deviennent hétérogènes chez les cellules vieilles. Environ 20 % des enzymes sont plus sensibles à la température et donc altérés chez les cellules vieilles. Récemment Golstein et Moerman (5) ont montré que l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase se comportait de la même manière. Le fait que ces modifications sont bien caractéristiques du vieillissement est encore appuyé par les expériences réalisées sur des fibroblastes d'enfants atteints du syndrome de Werner qui est une maladie où les enfants présentent très tôt des signes de vieillesse. Dans les cellules de ces enfants, on retrouve une modification de la thermolabilité des enzymes signalés ci-dessus.

- Un point commun nous a frappé dans l'étude de ces enzymes. C'est leur appartenance au compartiment cytoplasmique de la cellule. Nous avons voulu savoir si ces modifications se produisaient au niveau des enzymes d'autres compartiments subcellulaires et notamment si les enzymes lysosomiaux sont eux aussi altérés au cours du vieillissement. Cette étude pourrait orienter nos idées sur les deux hypothèses actuellement avancées pour expliquer ces modifications. Dans le cas où la cause du phénomène serait une modification au niveau des gènes ou de la synthèse des protéines, on devrait observer des modifications dans les enzymes de tous les compartiments subcellulaires; par contre, si la modification a comme cause une modification physiologique de l'enzyme après sa synthèse, cette perturbation atteindra différemment les enzymes des divers compartiments subcellulaires. Il est donc probable dans ce dernier cas que les enzymes lysosomiaux soient affectés différemment des enzymes du cytoplasme.

II. TECHNIQUE DE CULTURE DES CELLULES HUMAINES

1- Milieu de culture, pH, sérum -

Le milieu nécessaire à la croissance des cellules que nous avons utilisé est composé tout d'abord du milieu essentiel minimum de Eagle qui comprend 13 acides aminés et 8 vitamines. Il contient également des sels de Earle.

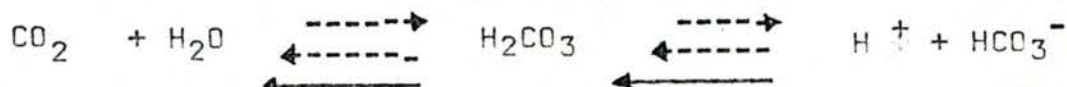
Table 1 - Liste des acides aminés et de vitamines contenus dans le milieu essentiel minimum de Eagle.

Acides aminés	Vitamines
L. arginine	choline - chlorure
L. cystine	acide folique
L. tyrosine	I - Inositol
L. Histidine HCl, H ₂ O	D - Pantothénate Ca
L. Glutamine	Pyridoxal HCl
L. isoleucine	Riboflavine
L. leucine	Thiamine HCl
L. lysine	
L. Methionine	
L. Phenylalanine	
L. Threonine	
L. Tryptophane	
L. Valine	

Table 2 - Sels de Earle

NaCl	
KCl	
CaCl ₂	2 H ₂ O
MgSO ₄	7 H ₂ O
glucose	
rouge de phenol	
Na	HCO ₃

Les éléments constitutifs du milieu sont envoyés par la firme Eurobio (Paris) sous forme de poudre. Celle-ci doit être dissoute dans 5 litres d'eau bidistillée à laquelle on a ajouté du bicarbonate de Na à raison de 11 gr et d'auroéomycine à raison de 250 mg. Ces ions bicarbonatés servent à tamponner le milieu. La valeur du pH exigée pour la culture des fibroblastes in vitro se situe entre pH 7,2 et pH 7,4. On préférera porter le pH du milieu à une valeur de 7,2 puisque le milieu contenant du bicarbonate a tendance à se basicifier à l'air suivant réaction.



Le CO_2 de l'air n'est pas en équilibre avec le HCO_3^- du milieu et la réaction est déplacée vers la gauche avec une alcalinisation du milieu si celui-ci est laissé en contact avec l'air. Or, un milieu basique est beaucoup plus toxique pour les cellules qu'un milieu acide, d'où le choix d'un pH 7,2 lors de la préparation du milieu.

La basicité ou l'acidité du milieu se marque par un virage de la coloration dû à la présence d'un indicateur (le rouge de phénol).

Le milieu acide est caractérisé par une coloration jaune, tandis que le milieu basique est mauve. La coloration du milieu peut donner une idée de l'évolution de la culture.

Normalement la quantité de HCO_3^- introduit dans le milieu tamponne celui-ci à pH 7,4 si la pression partielle du CO_2 est de 0,05 atmosphère, (soit une atmosphère contenant 5 % de CO_2 .)

a) Un milieu jaune-orange mais limpide témoigne d'une grande activité métabolique des cellules se traduisant par la production d'une grande quantité de CO_2 .

Cette coloration apparaît quand les cellules se divisent activement et en très grand nombre.

b) Un milieu mauve apparaît quand il y a peu de cellules dans la culture ou que la phase gazeuse est trop grande par rapport à la phase liquide.

c) un milieu jaune citron et trouble sera le signe d'une contami-

nation par bactéries ou par levures.

Dans le cas des levures, on sait que celles-ci se divisent environ toutes les demi-heures dans de bonnes conditions, ce qui se traduit par une production élevée de CO_2 .

Le trouble est dû à la grande quantité de levures dans le milieu.

N-B.

Une culture dont le milieu est basique peut être acidifiée en faisant barboter du CO_2 dans le milieu de culture.

Un autre moyen est d'introduire du CO_2 dans l'incubateur à 37° où sont stockées les cultures.

- Le sérum de fœtus de veau stérile est fourni par la firme Eurobio (Paris) dans des bouteilles de 100 ml. Le sérum arrive congelé. Ces 100 ml. vont être divisés dès leur arrivée en 10 tubes de 10 ml. qui vont être congelés.

Cette division des 100 ml. est importante car elle diminue le risque de contamination et elle va éviter des congélations et décongélations successives d'un même lot de sérum.

Les congélations et décongélations affectent en effet la capacité du sérum de promouvoir la croissance cellulaire.

Le sérum (S) sera ajouté au milieu de la culture (M) à raison de 10 ml. pour 90 ml. de milieu soit un milieu à 10 % de sérum (MS)

- L'auréomycine (Lederle Belge S.A. Bruxelles) est un antibiotique empêchant le développement des bactéries, il est ajouté au milieu à raison de 50 mg/ml.

2. Problème du verre.

Le verre des bouteilles sur lequel les cellules vont pousser doit répondre à plusieurs exigences. Il doit avant tout posséder des propriétés telles, que les cellules puissent s'y attacher. Rappaport (20) a montré que l'action du Na_2CO_3 à la surface du verre favorise l'attachement et la croissance des cellules.

En fait, les cellules possèdent à leur surface des charges négatives liées à la présence d'acides sialiques sur la membrane plasmique.

Les ions Na^+ provenant de Na_2CO_3 de même que les ions Mg^{++} joueraient un rôle intermédiaire entre les membranes plasmiques et la surface du verre et favoriseraient l'attachement des cellules.

Au niveau du laboratoire nous avons utilisé deux types de bouteilles.

1- Les bouteilles en plastique.

Ce sont des bouteilles plates n° cat. 3024 dont la surface (75 cm^2) a été prétraitée spécialement pour les cultures (firme Falcon Oxnard, ca. - U.S.A.) Il n'existe pas de problème d'attachement ni de croissance en ce qui concerne la première génération de cellules. Par contre, si les cellules sont cultivées successivement sur la même bouteille, la surface va s'altérer probablement du fait de l'échange entre les ions H^+ du milieu et les ions Na^+ ou Mg^{++} de la surface.

Les cellules au lieu de se répartir uniformément sur toute la surface de la bouteille vont former de petites colonies. La formation de ces aggrégats va fausser l'étude du vieillissement des cellules. En effet, les cellules situées au centre de la colonie ne se diviseront plus car elles sont entourées d'autres cellules, par contre les cellules en périphérie pourront continuer à se diviser. Les cellules ne seront donc plus homogènes quant au nombre de leurs générations. Les bouteilles Falcon sont jetées après deux repiquages.

2- Les bouteilles en verre.

Ces bouteilles rondes sont placées sur des supports tournant à 0,3 r. p. m. Seule la partie inférieure de la bouteille est en contact avec le milieu.

Nous avons d'abord utilisé des bouteilles en verre borosilicaté Sovirel. Les cellules ne s'attachaient pas très bien sur le verre et malgré les traitements aux acides, aux bases, au bicarbonate et au carbonate décrits dans la littérature (19,20), nous ne sommes pas parvenus à obtenir une culture homogène. Nous avons alors obtenu de la firme Wheaton scientific (Milville, N.J. - U.S.A. n° cat. 348052) des bouteilles de verre destinées spécialement aux cultures de cellules. Ces bouteilles nous ont donné immédiatement satisfaction après passage dans une solution HCl 0,01 M et des rinçages abondants.

Ces bouteilles ont comme dimension 118 mm de diamètre et 260 mm de hauteur. Le lavage et la stérilisation des bouteilles posent d'autres problèmes. Les bouteilles en verre ne sont pas lavées à l'acide chromique car toute trace de ce produit se révélerait toxique pour les cellules. Elles sont donc lavées avec un détergeant (De Decon 75 concentré provenant de la firme Decon laboratories L.T.D Brighton) et rincées abondamment avec de l'eau désionisée puis avec de l'eau distillée. Notons que le verre des bouteilles doit être assez résistant pour subir une stérilisation à sec à 180°.

3. Le repiquage.

Le repiquage se fait lorsque les cellules attachées au verre se sont divisées et ont atteint la confluence; il consiste à diviser en deux le contenu de la bouteille initiale et de le répartir dans deux bouteilles de même surface que la première afin d'obtenir une division cellulaire.

a) préparatifs

Il est nécessaire de préchauffer dans l'étuve à 37°C le milieu seul (M), le milieu contenant 10 % de sérum (M.S) et la trypsine 0,25 % (provenant de la firme Eurobio Paris). La hotte et tous les ustensiles sont nettoyés à l'alcool; les bouteilles et les pipettes ont été stérilisées.

b) Trypsinisation

Après avoir jeté M.S. de la bouteille, celle-ci est rincée avec M. Il est important qu'il ne reste plus de sérum dans la bouteille car celui-ci inhibe l'action de la trypsine. On ajoute alors la solution de trypsine de façon à ce qu'elle recouvre la couche de cellules. On la laisse agir 1 minute à température ambiante. La trypsine est éliminée et la bouteille est placée dans l'étuve à 37° pendant 10 minutes.

La trypsine qui a imprégné la couche de cellules agit sur les protéines de la membrane plasmique. Les cellules se détachent du verre et se séparent les unes des autres en s'arrondissant. Ce phénomène s'observe au microscope mais macroscopiquement il est possible de voir le feuillet cellulaire se détacher de la paroi qui devient

légèrement opaque alors qu'initialement elle était transparente.

Lorsque toutes les cellules sont détachées on ajoute 10 ml de M.S. A l'aide d'une pipette pasteur, on agite plusieurs fois le milieu afin de rompre les agrégats de cellules; la paroi où étaient attachées les cellules est aussi largement rincée. On ajoute ensuite 30 ml de M.S. Les 40 ml contenus dans la bouteille sont mélangés, on en prélève alors 20 ml que l'on va placer dans une autre bouteille.

4. La congélation et la décongélation des cellules.

- a) Congélation -

La congélation permet de stocker des cellules à un temps de génération déterminé.

Après décongélation les cellules ont conservé intact leur potentiel de division.

Une bouteille confluente est trypsinisée (cf. repiquage), les cellules sont reprises dans 5 ml de M.S. et placées dans un tube en plastique stérile. Le tube va être centrifugé 20 minutes à 800 r.p.m. à l'Internationale. Après centrifugation le surnageant est décanté avec une pipette pasteur stérile. Au culot on ajoute 0,4 ml de milieu contenant cette fois 40 % de sérum. Le tout est placé dans une ampoule stérilisée. Juste avant la congélation on ajoute 0,4 ml de dimethyl sulfoxide (DMSO) 20 %.

Le D M S O a été dilué dans le milieu de culture et passé sur filtre Sartorius afin de le stériliser. L'ampoule est fermée à la flamme et placée à 10° c dans un bain d'éthylène glycol 60 % que l'on refroidit immédiatement en faisant descendre la température de 1° c par minute jusque - 30° c. On place alors l'ampoule dans l'azote liquide à - 196° c.

- b) Décongélation et remise en culture.

L'ampoule dès sa sortie de l'azote liquide est plongée dans un bain à 40° c (la décongélation ne doit pas durer plus d'une minute) puis centrifugée 10 minutes à 500 r.p.m. L'ampoule est cassée et le surnageant est décanté au maximum. Les cellules sont placées dans une bouteille Falcon en présence de 20 ml de M.S.

On a testé en laboratoire l'effet de la concentration en D M S O sur la survie des cellules. On a donc congelé 4 tubes contenant

respectivement 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, de D M S O. Les cellules après décongélation ont été colorées avec une solution d'érythro-sine B préparée comme suit : 0,4 gr d'érythro-sine B et 0,81 gr de $N_a Cl$ sont ajoutés dans 100 ml de tampon phosphate 5 m M pH 7,4. La solution est chauffée pour dissoudre le colorant. On vérifie le pH qui doit être environ de 7,2. La solution est gardée à température ordinaire. La coloration se fait en ajoutant 0,1 ml d'érythro-sine à 1 ml de la suspension de cellules; les cellules sont alors comptées à l'hémocytomètre.

Les cellules vivantes n'incorporent pas le colorant. (Il est à noter que le sérum de veau foetal interfère avec la coloration à une concentration supérieure à 10 %.).

Le % de cellules vivantes est égal au rapport du nombre de cellules non colorées sur le nombre total de cellules, multiplié par 100.

Voici les résultats obtenus :

Table 3 - Proportion de cellules vivantes et mortes en rapport avec la quantité de D M S O utilisée lors de la congélation.

N° tube	% DMSO	Nombre de cellules comptées à l'hémocytomètre		
		non colorées	colorées	% des cellules vivantes
1	5	33	28	54
2	10	85	68	56
3	15	42	72	37
4	20	14	39	26

La quantité de D M S O la plus favorable pour la congélation des cellules est 10 %.

C'est en effet pour cette valeur que le % des cellules vivantes est le plus grand.

C'est ce % que l'on choisira pour les expériences de congélation suivantes.

Remarque.

L'hémocytomètre permet de compter le nombre de cellules contenues

dans un volume connu.

Il s'agit d'une plaque de verre sur laquelle ont été tracées toute une série de lignes délimitant des carrés. Un couvre objet étant placé sur l'hémocytomètre, on introduit une goutte du milieu contenant les cellules entre le couvre objet et l'hémocytomètre. On compte le nombre de cellules contenues dans les carrés. Connaissant la surface de ces carrés et la hauteur entre la lame et l'hémocytomètre, il est possible de connaître la quantité de cellules contenues dans un volume délimité par un carré et d'en déduire la quantité de cellules par mm^3 et par cm^3 .

5. Contamination et stérilisation.

Pour éviter les contaminations des cultures par les différents germes, de nombreuses précautions doivent être prises. Tout objet, toute substance qui entre en contact avec la culture, doit être stérile.

a- La hotte à flux laminaire

Toutes les manipulations sur les cultures, le milieu de culture etc.. se feront sous la hotte. Celle-ci filtre l'air ambiant et le souffle dans la hotte vers l'extérieur, si bien que l'air à l'intérieur de la hotte est stérile.

La hotte avant chaque manipulation est lavée entièrement à l'alcool de même que tout objet non stérilisé qui y est introduit.

b- Stérilisation à sec

Avant de stériliser les pipettes, on introduit un bout d'ouate à leur extrémité pour empêcher le contact direct de la bouche avec le milieu et ainsi éviter le passage de germes. Ces pipettes sont placées dans un canon qui est introduit dans le stérilisateur.

Les bouteilles sont stérilisées sans les bouchons. Avant de le placer dans le stérilisateur, on les ferme avec du papier gris et une feuille d'aluminium. Le papier gris joue un rôle de filtre. En effet, lorsque la température s'élève dans le stérilisateur il y a dilatation de l'air, inversement quand la bouteille se refroidit, l'air se contracte avec comme conséquence un appel d'air à l'intérieur

de la bouteille. Le papier gris intervient pour filtrer l'air provenant de l'extérieur. Le papier d'aluminium sert plutôt de protection mécanique.

La stérilisation se fait par chauffage à 180° C pendant 6 heures.

c- Stérilisation à l'autoclave

La stérilisation à l'autoclave se fait pendant 20 minutes à 120°C sous une pression d'1 atmosphère.

Cette stérilisation est utilisée principalement pour les objets en plastique comme les filtres Sartorius, les bouchons de bouteilles et pour l'appareillage servant à filtrer le milieu.

d- Les filtres

Les filtres provenant de la firme Sartorius Göttingen R.F.A. n° cat. SM.11307, permettent de stériliser les solutions qui entreront en contact avec la culture, c'est le cas par exemple du D M S O lors de la congélation. Ces filtres retiennent les particules de diamètre supérieur à 0,2 μ .

e- Stérilisation du milieu.

Nous utilisons un appareil de filtration SM 162.68 Sartorius qui permet de filtrer rapidement le milieu.

L'appareil de filtration proprement dit a été stérilisé à l'autoclave : il comporte une membrane filtrante Sartorius n° SM 11307 et un préfiltre n°SM 13400, il est connecté à un réservoir contenant le milieu non stérile qui est lui-même relié à une bonne d'azote. En exerçant une pression sur le réservoir, le gaz chasse le milieu vers l'appareil de filtration. Le milieu filtré est recueilli dans une bouteille stérile.

f- Précautions diverses

Les précautions habituelles de tout travail stérile doivent être respectées, par exemple : maintenir la propreté de la pièce, utiliser la stérilisation par une lampe ultra violet, passer à la flamme les pipettes et le goulot des bouteilles avant toute manipulation.

6. Origine des cellules utilisées.

Les fibroblast~~x~~es que nous avons utilisés sont les fibroblast~~x~~es de la souche W I 38 qui ont été mis en culture par Hayflick (6) il s'agit de cellules provenant de poumon de foetus humain. Nous avons reçu deux lots de cellules se trouvant respectivement à la 25e et à la 18e génération. Les bouteilles reçues étaient remplies complètement de milieu contenant 1 % de sérum. Dans ces conditions les cellules peuvent se conserver plus longtemps. Dès la réception des bouteilles le milieu est éliminé et l'on remet du milieu contenant 10 % de sérum. Les bouteilles sont alors placées à l'étuve à 37°C.

III. DOSAGE ENZYMATIQUE

Deux enzymes vont être particulièrement étudiés :

1' α - glucosidase et la N-acetyl β glucosaminidase.

1) Caractéristiques des enzymes.

1- 1' α - glucosidase

Lejeune et Col (15) ont montré que dans le foie de rat 1' α - glucosidase est localisé e dans les lysosomes. Chez l'homme (11), cet enzyme possède deux types d'activités : une activité hydrolase acide et deux activités transglucosylase (l'une présente un optimum à pH acide et l'autre à pH neutre).

Il semble cependant que 1' α -glucosidase ne possède pas d'iso-enzyme car aucun isoenzyme de 1' α -glucosidase n'a été mis en évidence par les procédés de purification. (3).

Chez les animaux supérieurs 1' α -glucosidase aurait une activité sur les α -(1,4) et α -(1,6) glucosides; cette activité est nécessaire pour dégrader le glycogène qui pénètre dans les lysosomes par autophagie (28), 1' α -glucosidase joue également un rôle dans la dégradation du maltose chez les tissus humains (11).

2- la N-acetyl- β -glucosaminidase

Sellinger et Col. ont montré que la N- acetyl - β -glucosaminidase se trouve dans les lysosomes (21). Cet enzyme possède deux isoenzymes A et B actifs.

Le composé A lors d'une électrophorèse à pH 7 est chargé négativement et migre rapidement vers l'anode tandis que le composé B est chargé positivement et migre lentement vers la cathode.

L'action de la neuraminidase sur l'isoenzyme A peut transformer celui-ci en isoenzyme B.

L'isoenzyme A se différencie de l'isoenzyme B par la présence d'un certain nombre d'acides sialiques.

Les deux isoenzymes A et B ont une activité maximale à pH acide et possèdent le même Km donc la même affinité pour le substrat.

Cependant la forme A est plus sensible à la chaleur que la forme B; d'autre part l'isoenzyme B est stable entre pH 3 et pH 7 tandis que le composé A est rapidement dénaturé si le pH est d'une unité supérieure au pH optimum. Cette propriété va nous permettre d'inactiver l'isoenzyme A et de travailler uniquement avec l'isoenzyme B.

La fonction de la N-acetyl- β -glucosaminidase est la dégradation hydrolytique de glycoprotéines, mucopolysaccharides ou glycolipides qui contiennent de la N-acetylhexosamine (24).

2- Substrats utilisés pour le dosage

Les substrats employés pour le dosage de l' α -glucosidase et de la N-acetyl- β -glucosaminidase sont des substances fluorogènes, substituées en position 7 de la méthylumbelliférone ou 4 méthyl-7 hydroxycoumarine; soit pour l' α -glucosidase : la méthylumbelliferyl α -D-glucopyranoside et pour la N-acetyl- β -glucosaminidase : la méthylumbelliferyl acétamido 2 déoxy β -D-glucopyranoside.

Ces substrats proviennent de la firme Koch light Buckinghamshire England.

Lors de la réaction enzymatique, il y a hydrolyse du substrat avec libération de la méthylumbelliférone, une substance fluorescente qui sera dosée au fluorimètre (American instrument company).

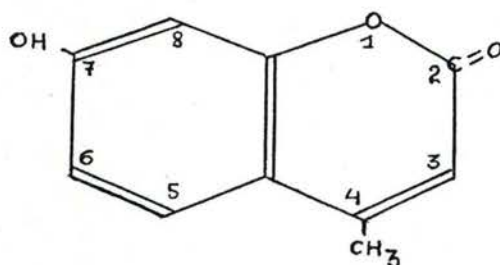


Figure 2- Méthylumbelliférone ou 4 méthyl - 7 hydroxycoumarine.

3- Préparation de l'homogénat de cellules

Le dosage est précédé de la préparation de l'homogénat des cellules de la culture (26).

Le milieu contenu dans la bouteille est éliminé, celle-ci est rincée deux fois avec 10 ml de P.B.¹⁵ Celui-ci sert à éliminer toute trace de milieu, de sérum. On ajoute ensuite 5 ml d'une solution de sucrose 1/4 M contenant 1 m M d' EDTA; les cellules sont détachées du verre avec un petit racloir. Les cellules en suspension sont vidées dans des tubes coniques. Pour récupérer le maximum de cellules, il est conseillé de recommencer trois fois le processus. Les quatre tubes coniques sont alors centrifugés dans la centrifugeuse de colle à 500 r.p.m. Le culot est suspendu dans 3 ml de sucrose 1/4 M. Les cellules sont homogénéisées dans un petit dounce (Kontes Glass Co. Vineland, n.j.) à l'aide du piston serré B par une vingtaine de coups.

4- Dosage proprement dit.

Le schéma de dosage est le même pour l' α -glucosidase et la N- acetyl - β - glucosaminidase : la mixture test est composée de substrat : soit la méthylumbelliferyl acétamido 2 deoxy (β -D - glucopyranoside (M.A.d.G) soit la méthylumbelliferyl α -D -glucopyranoside (M.U. G) dissous à une température d'environ 60°C dans un tampon citrate 50 m M pour la M.A.d.G., dans un tampon acetate 50 m M pour la M.U.G. La concentration du substrat est de 1 mM .

Cette mixture test comprend du triton X100 0,2 % dont le rôle est de rompre les membranes lysosomiales et de permettre la mesure de l'activité totale des enzymes.

On ajoute à 0,4 ml de mixture test, 0,1 ml d'homogénat de cellules. Le tout est incubé 1 heure à 37°C. Après 60 minutes, la réaction est arrêtée par 2 ml de tampon glycine - Na OH 50 mM à pH 10,5 contenant 5 m M d'EDTA. La quantité de méthylumbelliférone (produit de l'hydrolyse du substrat par les deux enzymes) est mesurée au fluorimètre (Aminco) avec une lumière d'excitation de 360 nm et une lecture de la fluorescence à 467 nm.

Voici quelques caractéristiques de ces enzymes.

a) Courbe de pH

Nous avons déterminé le pH pour lequel l'activité enzymatique est maximale.

Pour chacun des enzymes nous avons utilisé 3 tampons pour réaliser une gamme de pH allant de pH 1 à pH 8. (voir fig.3). Le schéma du dosage pour déterminer la courbe de pH est un peu modifié par rapport au schéma général. On dissout le substrat à une concentration de 4/3 mM dans de l'eau contenant 0,2 % de triton X100. On ajoute à 0,3 ml de substrat, 0,05 ml des différents tampons (ayant une concentration de 0,5 M) et 0,05 ml d'eau. A cette mixture on ajoute 0,1 ml d'enzyme, la suite du dosage est identique au schéma général. Nous avons obtenu pour l' α -glucosidase un maximum d'activité à pH 4,5 dans le tampon acétate et pour la N -acétyl.- β -glucosaminidase un pH optimum de 3,5 dans le tampon citrate.

b) Cinétique des deux enzymes.

Nous savons que pour avoir des indications sur la quantité d'enzyme le dosage doit se faire dans des conditions de saturation du substrat; à ce moment la réaction sera d'ordre 0 par rapport au substrat et l'activité enzymatique sera proportionnelle à la quantité d'enzyme. Nous avons établi des courbes d'activité enzymatique en fonction de la concentration en protéines utilisée afin de vérifier cette linéarité.

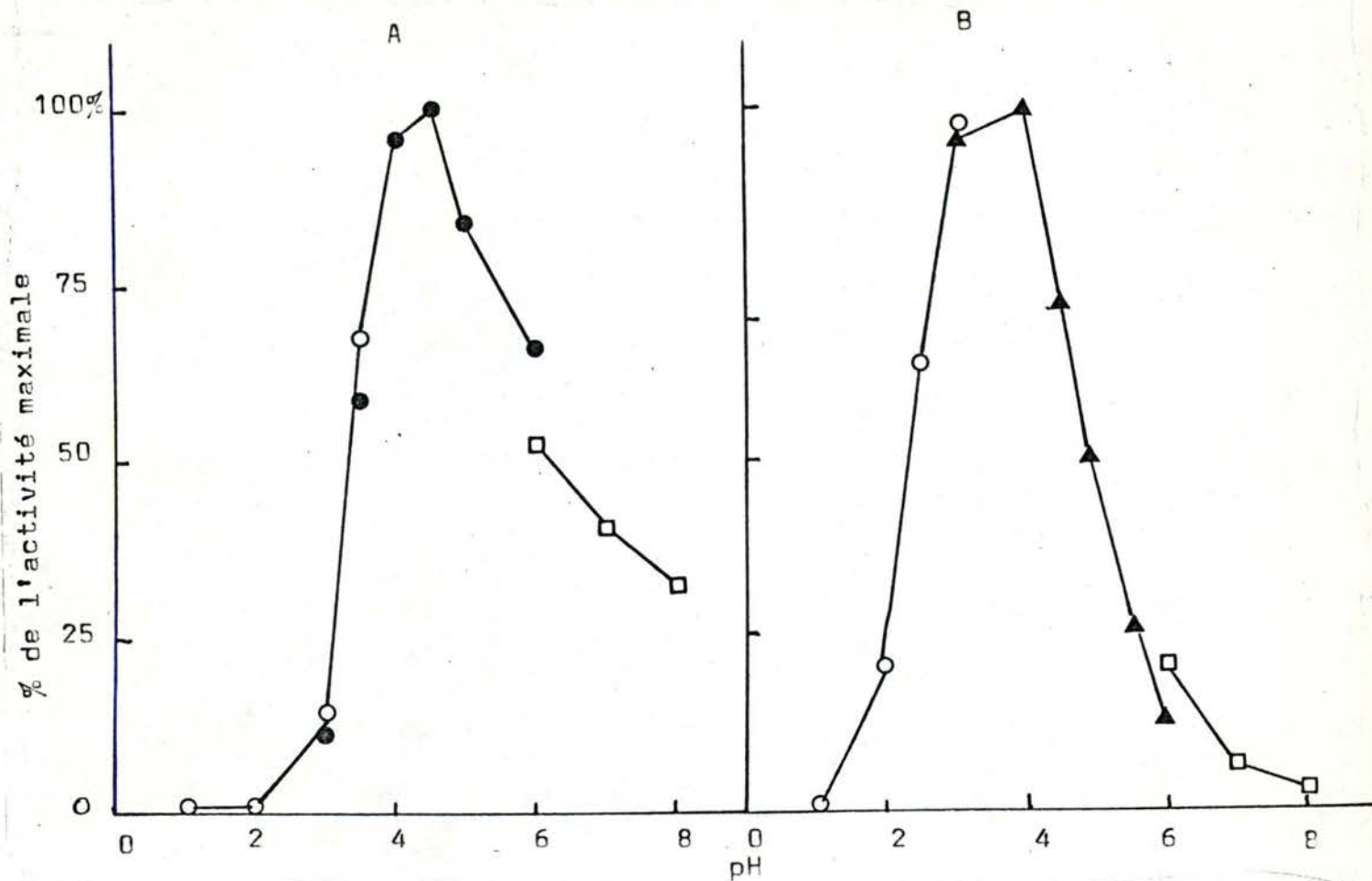


Figure 3

Courbe d'activité en fonction du pH de l' α -glucosidase (A) et de la N- acétyl- β - glucosaminidase (B) d'un homogénat de fibroblastres humains W I 38. Les réactions se réalisaient dans différents tampons :

○: phosphate, ●: acétate, ▲: citrate, □: imidazole.

La figure 4 montre que l'activité des deux enzymes est bien proportionnelle à la quantité de protéines ajoutée dans le dosage.

Cette Linéarité est en tout cas valable jusqu'à l'hydrolyse de 0,4 n. moles de substrat.

Notons que cette valeur est atteinte avec 200 μ g de protéine de l'homogénat pour l' α -glucosidase alors qu'il n'en faut que 3,5 μ g pour la N - acétyl - β - glucosaminidase.

-Voici les conditions utilisées finalement pour le dosage de l' α -glucosidase et de la N - acétyl - β - glucosaminidase chez les fibroblastes humains W I 38 : 0,1 ml d'enzyme (dont la concentration est d'environ 3,5 μ g/ml pour la N - acétyl - β - glucosaminidase et de 200 μ g/ml pour l' α -glucosidase) est ajouté à 0,4 ml de substrat (soit M.A.d.G. ou M. U .G.) 1 mM dissous dans un tampon acétate 50 mM pH 4,5 (pour l' α - glucosidase) ou citrate 50 mM pH 3,5 (pour la N- acétyl - β - glucosaminidase). Les deux tampons contiennent 0,2 % de triton X 100. Le tout est incubé une heure à 37° puis fixé par 2 ml de tampon Na OH - glycine 50 mM pH 10,5 contenant 5 mM EDTA.

La quantité de méthylumbelliférone est mesurée au fluorimètre Aminco avec une lumière d'excitation de 360 nm et une lecture de la fluorescence à 467 nm.

Remarque : le dosage de la N-acétyl - β - glucosaminidase se fait en présence de 0,1 % albumine bovine.

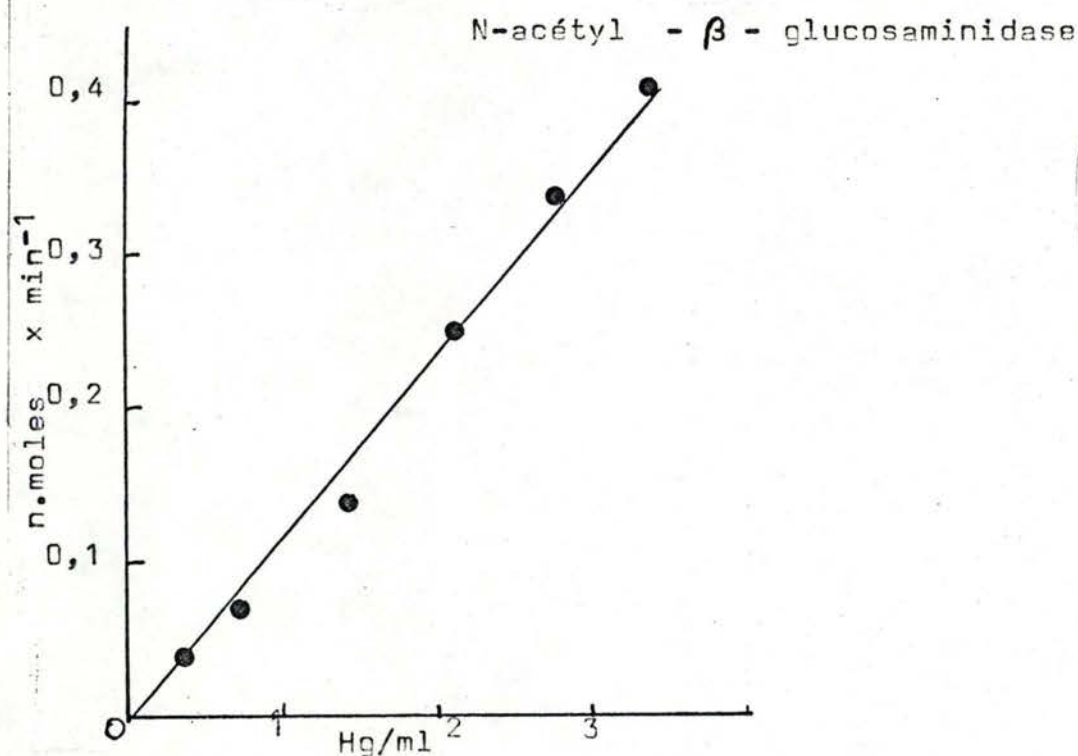
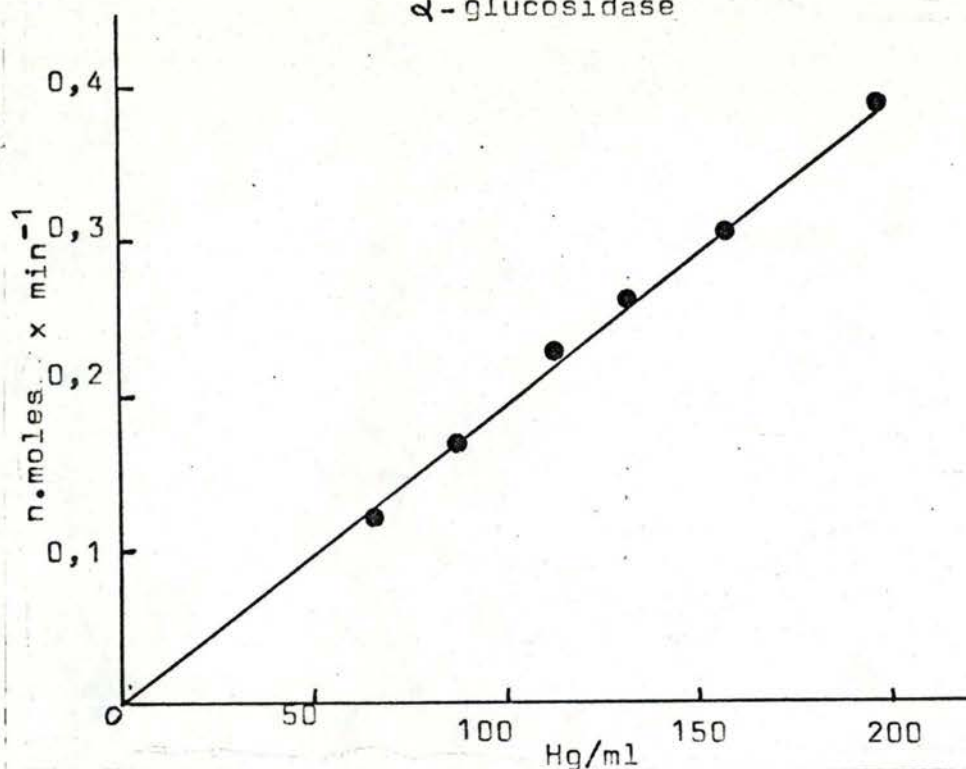


Figure 4

Cinétique de l' α -glucosidase et de la N-acétyl - β - glucosaminidase de fibroblastes W I.38. L'activité est exprimée en fonction de la concentration de protéines.

5- Inactivation de l'isoenzyme A de la N-acétyl - β - glucosaminidase A et courbes de température.

Avant d'étudier la thermolabilité des deux enzymes en fonction du temps, il est nécessaire d'élucider deux problèmes.

a) Inactivation de l'isoenzyme A de la N-acétyl - β - glucosaminidase.

Il faut d'abord inactiver l'isoenzyme A de la N acétyl - β - glucosaminidase afin de travailler avec un enzyme homogène.

Pour l' α - glucosidase, il ne semble pas y avoir de problème car nous n'avons pas trouvé dans la littérature (11, 3) d'indice permettant de prévoir l'existence d'isoenzymes.

En ce qui concerne la N-acétyl - β - glucosaminidase, nous avons vu que l'isoenzyme B est stable entre pH 3 et pH 7 mais que l'isoenzyme A est rapidement dénaturé si l'enzyme est incubé à un pH qui est d'une unité supérieure au pH optimum (21).

Nous avons donc inactivé la N-acétyl - β - glucosaminidase A en incubant l'homogénat de cellules à 37 ° pendant une heure dans un tampon imidazol 3 m M à pH 7 contenant 0,1 % d'albumine bovine afin de stabiliser l'enzyme. Comme contrôle, nous avons incubé un autre homogénat à 37°, dans un tampon citrate 3 m M à pH 4 contenant 0,1 % d'albumine.

L'activité enzymatique est mesurée à intervalles de temps réguliers (voir fig.5).

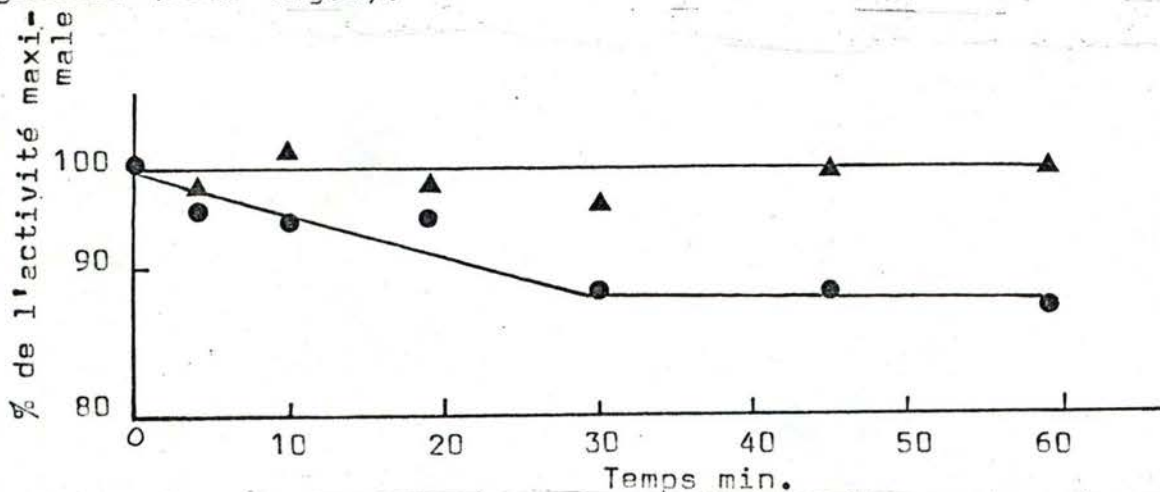


Figure 5.

Activité de la N-acétyl - β - glucosaminidase en fonction du temps d'incubation à 37°C; ▲ : incubation à pH 4
● : incubation à pH 7.

Lorsque l'enzyme est incubé à pH 4, son activité après une heure, n'a pas changé; par contre lors de l'incubation à pH 7, son activité diminue de 12 % pendant les vingt premières minutes, puis se stabilise.

Nous pouvons conclure que la N-acétyl - β - glucosaminidase A est inactivée après vingt minutes d'incubation à pH 7 et représente 12 % de l'activité totale de la N-acétyl - β - glucosaminidase.

La N-acétyl - β - glucosaminidase B qui représente 88 % de l'activité totale est stable puisque son activité ne se modifie plus après les vingt premières minutes d'incubation à pH 7.

b) Courbes de température.

Un deuxième problème est de trouver la température d'inactivation la plus appropriée pour étudier le phénomène de thermolabilité des deux enzymes.

Nous avons étudié l'activité des deux enzymes lysosomiaux après incubation de 30 minutes à différentes températures.

L' α -glucosidase et la N-acétyl - β - glucosaminidase B sont incubés respectivement dans un tampon acétate 10 m M pH 4,5 et dans un tampon citrate 50 m M pH 3,5.

Après 30 minutes d'incubation les deux enzymes sont dosés normalement.

La courbe d'inactivation des deux enzymes en fonction de la température est donnée à la figure 6.

Nous avons choisi pour réaliser les courbes de thermolabilité des enzymes en fonction du temps, une température de 63 ° pour l' α -glucosidase et de 49° pour la N-acétyl - β - glucosaminidase, ce qui devrait donner une inactivation de 60 à 70 % après 30 minutes d'incubation.

Les expériences sur la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase ont été réalisées suivant les méthodes décrites par Holliday et Tarrant (12).

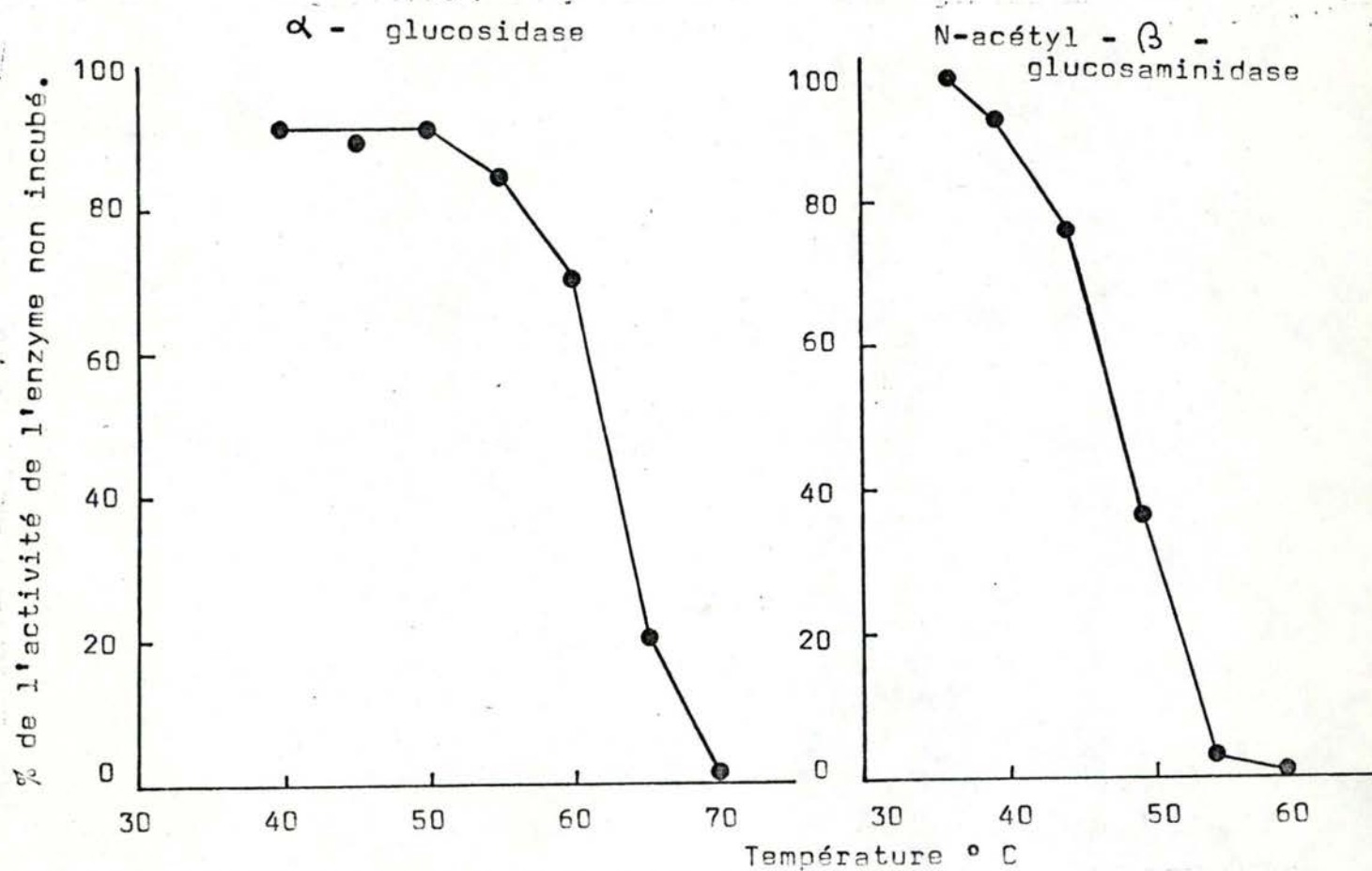


Figure 6 -

Courbe d'inactivation de l' α -glucosidase et de la N-acétyl - β - glucosaminidase B après incubation pendant 30 minutes à diverses températures. L'activité est donnée en % de l'activité de l'enzyme non incubé.

IV. THERMOLABILITE DES ENZYMES AU COURS DU VIEILLISSEMENT DES CELLULES

Notre projet est d'étudier la thermolabilité au cours du vieillissement de l' α -glucosidase et de la N-acétyl - β - glucosaminidase B (enzymes lysosomiaux de fibroblast~~x~~es humains WI38) en comparaison avec la thermolabilité de la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase dont nous savons qu'une partie de l'enzyme s'altère au cours du vieillissement.

Cette altération se marque par une dégradation plus rapide à 60° d'une fraction de l'enzyme (12).

Cette étude s'est portée sur des fibroblast~~x~~es à la 22e, 39e et 43e génération. A la 22e génération, les cellules sont jeunes et se multiplient très activement, à la 39e génération le temps de division des cellules est fortement augmenté par rapport aux cellules jeunes, à la 43e génération, les fibroblastes ont toutes les caractéristiques des cellules vieilles avec une augmentation des granulés à l'intérieur du cytoplasme, une diminution de la densité des fibroblastes en culture et l'apparition du phénomène de dégénérescence. Les cellules ont atteint un maximum de 46 générations avant de cesser tout à fait de se diviser.

1) Comparaison de l'activité enzymatique au cours du vieillissement -

Si l'on compare les activités spécifiques des enzymes sur les trois types de cellules utilisées pour faire les courbes de thermolabilité (voir tableau 4), l'on remarque que l'activité de l' α -glucosidase est plus élevée chez les cellules vieilles que chez les jeunes; la N-acétyl - β - glucosaminidase présente elle aussi une augmentation pour les cellules de la 39e^{génération} mais une chute pour les cellules vieilles. Nous retrouvons ici le problème des variations des valeurs absolues d'activité rencontré par plusieurs auteurs et qui proviennent plus des fluctuations dues au cycle de croissance cellulaire qu'au phénomène de vieillissement proprement dit (25).

Table 4 :

Evolution de l'activité spécifique de l' α -glucosidase et de la N-acétyl - β - glucosaminidase au cours du vieillissement.

Générations	Activité spécifique m. U /mg protéine	
	α -glucosidase	N-acétyl - β - glucosaminidase
22	1,36	45,00
39	1,80	71,30
43	1,77	36,21

2) Expérience proprement dite -

Les trois enzymes sont incubés à 62° et 63° pour l' α -glucosidase 49° pour la N-acétyl - β - glucosaminidase et 60° pour la glucose - 6 - phosphate deshydrogénase respectivement dans les tampons acétate 10 m M pH 4,5, le tampon citrate 50 m M pH 3,5 et le tampon tris -Hcl 50 m M pH 8.

L'enzyme est prélevé à différents moments et incubé 1 heure à 37°C avec son substrat.

L'activité est mesurée en % de l'activité de l'enzyme non incubé.

A la 22e génération on remarque que l'activité des trois enzymes diminue de façon linéaire en fonction du temps d'incubation en échelle semi logarithmique. Le comportement chez les cellules jeunes, des enzymes lysosomiaux est donc identique à celui de la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase qui est un enzyme du cytoplasme (fig.7). Vu la linéarité du phénomène, on peut considérer que les trois enzymes sont homogènes.

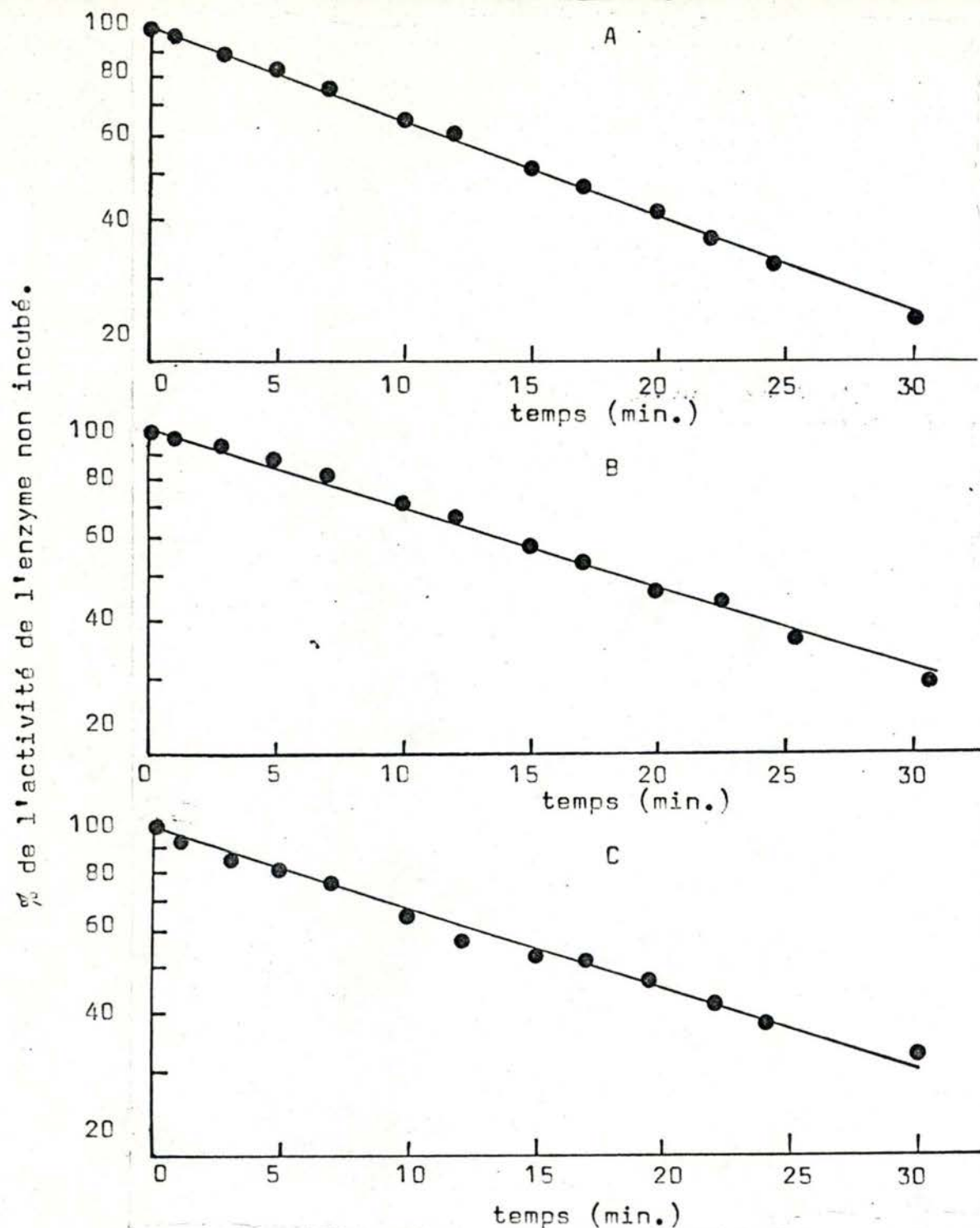


Figure 7 : Courbe d'inactivation en fonction du temps de l' α -glucosidase à 63° (A) de la N-acétyl - β - glucosaminidase (B) à 49° (B), de la glucose-6-phosphate déshydrogénase à 60° (C) de fibroblastes W 138 à la 22^e génération. En abscisse nous avons le % de l'activité par rapport à l'activité de l'enzyme non incubé.

A la 39e génération (fig.8) on constate que la courbe d'inactivation de la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase en échelle semi logarithmique est caractérisée par une rupture de pente après 3 minutes d'incubation. En fait, la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase provenant de fibroblastes qui vieillissent commence à s'altérer. La partie altérée étant plus labile, s'inactive plus vite et sa disparition se marque surtout au cours des 3 premières minutes. Il reste alors l'enzyme intact, qui s'inactive plus lentement.

La fraction altérée de la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase représente 10 % de l'activité totale (fig.8).

Le même phénomène se passe pour la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase à la 43e génération, cependant la rupture de pente se fait après 10 minutes et la fraction altérée est plus importante, elle représente 20 % de l'activité totale.

Par contre, l'inactivation de l' α -glucosidase et de la N-acétyl - β - glucosaminidase B à la 39e et 43e génération se fait linéairement en échelle semi logarithmique comme c'était le cas chez les cellules jeunes.

Il semble donc que ces deux enzymes lysosomiaux ne subissent pas d'altération au cours du vieillissement, contrairement à la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase.

% de l'activité de l'enzyme non incubé.

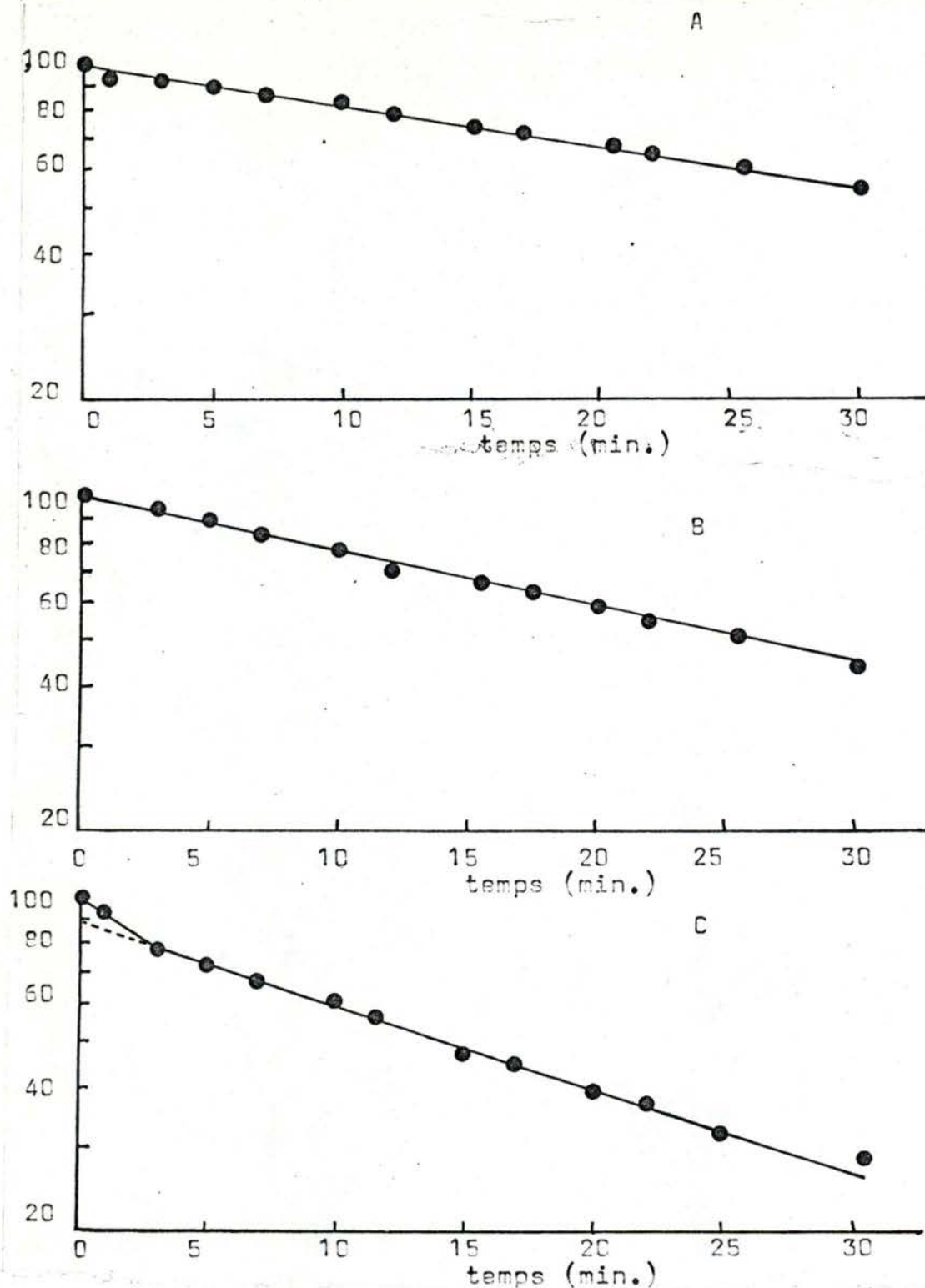


Figure 8 :

Courbe d'inactivation en fonction du temps de l' α -glucosidase à 62° (A) de la N-acétyl - β - glucosaminidase B à 49° (B) de la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase à 60° (C) de fibroblastes humains W 138 à la 39e génération .

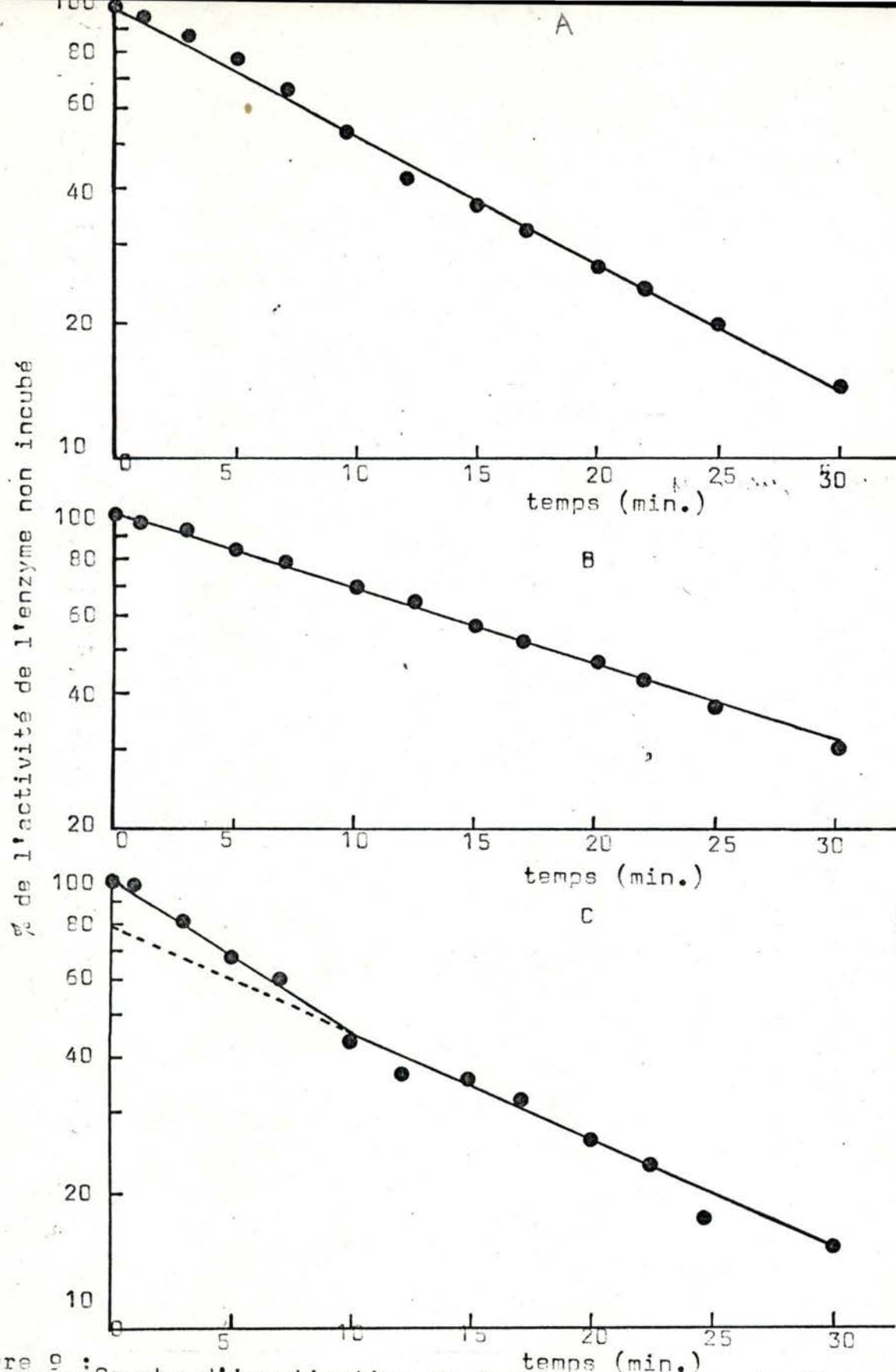


Figure 9 : Courbe d'inactivation en fonction du temps de l' α -glucosidase à 63° (A), de la N- acétyl - β - glucosaminidase B à 40° (B), de la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase à 60° (C) de fibroblastes W 138 à la 43e génération.

V. DISCUSSION

Deux théories sont actuellement proposées pour expliquer le mécanisme du vieillissement.

1- Il y a d'abord l'hypothèse du vieillissement programmé : il existerait au niveau de la cellule des mécanismes qui provoqueraient la sénescence à un temps approprié. Ces mécanismes^{se} situeraient au niveau des gènes et des contrôles génétiques et constitueraient une horloge moléculaire qui compterait les divisions.

Cette théorie expliquerait la constance du nombre de générations obtenu sur une même lignée cellulaire. Récemment Packer et Col. (18) ont introduit une faible dose de vitamine E dans la culture des cellules W 138 et ont constaté une augmentation très élevée du nombre de générations.

Si la vitamine E se révèle effectivement capable de modifier le nombre de générations des cellules en culture, ce serait un argument important à l'encontre de cette théorie.

2- Une autre explication du vieillissement est donnée par la théorie d'Orgel ou théorie de l'erreur catastrophique (17). Lors de la synthèse de protéines, deux étapes sont cruciales pour la synthèse correcte de la protéine : il y a d'abord la reconnaissance par le t R N A transférase de l'acide aminé à fixer sur le t R N A puis l'appariement correct du codon du R N A et de l'anticodon du t R N A. Chacun de ces processus se passe avec une certaine fréquence d'erreur.

Au niveau de la synthèse de R N A, il peut également y avoir certaines imperfections. Toutes ces erreurs pourraient donc former des protéines altérées. Comme les protéines font elles-mêmes partie du mécanisme de synthèse de protéines, les erreurs vont se propager par feed-back positif.

Finalement une erreur catastrophique conduira à la mort de la cellule. Ce sera le cas s'il y a par exemple altération de la D N A polymérase ou des autres enzymes impliqués dans la synthèse protéique.

Expérimentalement, il est difficile de discerner l'origine de

l'altération des protéines. En effet, des erreurs observées sur des protéines peuvent provenir d'un mauvais fonctionnement de l'appareil de synthèse, de modifications survenant après leur synthèse ou de mutations somatiques.

Il est possible de généraliser la théorie de l'erreur des protéines proprement dite, en théorie plus générale de l'erreur des constituants macromoléculaires. " L'idée de feed back positif est retenue c'est-à-dire que plus le nombre d'erreurs dans les constituants macromoléculaires augmente, plus l'accumulation d'erreurs supplémentaires est rapide ". (17) . Les erreurs peuvent se situer au niveau de mutations, du relâchement des processus de contrôle, de membranes défectueuses, d'erreur dans la synthèse de protéines sans donner de priorité à un processus particulier.

Plusieurs expériences sont en faveur de cette hypothèse. Fulder et Tarrant (4) ont montré que pour l'ornithine décarboxylase qui est un enzyme inductible, le temps nécessaire à l'apparition de l'activité après induction est plus long chez les cellules vieilles que chez les cellules jeunes. Cela pourrait s'expliquer par une déficience dans l'interaction entre le répresseur et l'inducteur dans les cellules vieilles. Une augmentation de l'ornithine décarboxylase chez les cellules vieilles pourrait s'expliquer par des erreurs au niveau des protéines intervenant dans la régulation ou dans la dégradation de l'enzyme.

Fulder et Tarrant ont également mis en évidence une augmentation de la tyrosine amino transférase (enzyme présent dans le foie et réprimé dans la plupart des autres tissus chez l'homme) chez les fibroblastes sénescents. Cette observation suggère qu'il y a eu une dépression au cours du vieillissement.

Les résultats obtenus par Holliday et Tarrant sont également en faveur de la théorie d'Orgel. En effet, ils ont montré que la proportion de glucose - 6 - phosphate déshydrogénase et de 6 - phosphogluconate déshydrogénase thermolabiles augmente avec le nombre de divisions; il y aurait une altération de ces deux enzymes au cours du vieillissement. Pour prouver que l'altération est due à un défaut de synthèse. Holliday et Tarrant (12) ont cultivé les cellules en présence de 5 - fluorouracil une base analogue qui, incorporée dans le R N A, induit des erreurs de transcription et de traduction; ils constatè-

rent un vieillissement prématuré de la culture avec une augmentation de la thermolabilité d'une fraction de la glucose 6 -phosphate Déshydrogénase et de la 6 -phosphogluconate déshydrogénase.

Ce sont les expériences de Holliday et Tarrant qui illustrent actuellement le mieux la théorie d'Orgel.

Cependant, les expériences de Ryan et Co (77) et nos propres expériences sont en contradiction avec cette même théorie. Ryan et Col. ont montré que deux analogues d'acides aminés, la p. fluorophénylalanine et l'éthionine diminuent pas le nombre de divisions des fibroblastes W 138 lorsqu'ils sont ajoutés à la culture à des concentrations assez faibles pour ne pas être toxiques. Or, il a été prouvé que ces acides aminés sont incorporés aux protéines à ces faibles concentrations. Ils pourraient donc selon la théorie des erreurs, introduire des erreurs au niveau des protéines responsables de la synthèse protéique et provoquer un vieillissement prématuré. Cela n'a pas été observé : les cellules traitées avec les analogues d'acides aminés atteignent le même nombre de divisions que les cellules témoins (sauf si la concentration en acides aminés est trop forte et dès lors toxique pour la cellule).

D'autre part, nos expériences montrent que deux enzymes lysosomiaux, la N-acétyl - β - glucosaminidase B et l' α -glucosidase ne sont pas altérés au cours du vieillissement. En effet, lors de l'étude de leur thermolabilité nous n'avons pas pu mettre en évidence une fraction plus sensible à la chaleur chez les cellules vieilles alors que cette fraction thermolabile apparaît très bien pour la glucose 6-phosphate déshydrogénase. Il y a donc une différence de comportement au cours du vieillissement entre les enzymes lysosomiaux (N-acétyl - β - glucosaminidase B et l' α -glucosidase) et les enzymes cytoplasmiques (glucose - 6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase et hypoxanthine - guanine phosphoribosyltransférase).

Nous pouvons émettre trois hypothèses pour expliquer ces résultats.

Il se pourrait que la fraction altérée de la glucose-6-phosphate déshydrogénase proviennent de cellules mortes. En effet, lorsque les cellules meurent, les lysosomes libèrent leur contenu et ils altèreraient ainsi les protéines et plus particulièrement les enzymes de la fraction cytoplasmique, qui deviendraient ainsi plus sensibles à la chaleur. Ce fait pourrait être vérifié si on mesure par exemple la thermolabilité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase avant et après l'incubation d'un homogénat de cellules jeunes en présence d'enzymes lysosomiaux.

Une augmentation de la thermolabilité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase serait en faveur d'une altération postmortem de l'enzyme. Dans ce cas les résultats de Holliday et Tarrant ne consisteraient plus une preuve en faveur de la théorie d'Orgel et il serait possible que la 5-fluorouracil qui diminue le nombre de division des cellules soit en fait toxique et fasse mourir les cellules avec libération des lysosomes et altération de la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Une deuxième hypothèse serait que les membranes des lysosomes devenant plus sensibles au cours du vieillissement se rompent et laissent échapper leur contenu. Celui-ci provoquerait l'altération des enzymes cytoplasmiques. Cette hypothèse pourrait se vérifier en établissant une courbe d'activité libre des enzymes lysosomiaux chez les cellules vieilles et chez les cellules jeunes. L'activité totale serait plus rapidement atteinte chez les cellules vieilles si leurs membranes lysosomiales sont plus sensibles. Nous avons fait un premier essai de ce genre mais la comparaison entre les activités libres de préparations de lysosomes de deux cultures différentes est très difficile à réaliser.

Dans le cas où les lysosomes ne sont pas à l'origine de l'altération de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, on peut admettre que cette altération a pour origine un défaut dans le mécanisme de synthèse de protéines ou dans un constituant macromoléculaire.

Cependant, contrairement à la théorie d'Orgel, l'altération des protéines ne se ferait pas au hasard puisque les enzymes lysosomiaux ne sont pas altérés, il y aurait une certaine direction dans le processus de vieillissement.

VI. BIBLIOGRAPHIE

- 1- CRISTOFALO V.J. 1971. Animal cell cultures as a model system for the study of aging. *Exp. Geront.* 4 : 45 - 79.
- 2- CRISTOFALO, V.J., PARRIS N. and KRITCHEVSKY D. 1967. Enzyme activity during the growth and aging of human cells in vitro. *J. Cell. Physiol.* 69 : 263 - 272.
- 3- de BARSY T., JACQUEMIN P., DEVOS P. and HERS H.G. 1972. Rodent and Human acid α -glucosidase Purification, properties and inhibition by antibodies. Investigation in type II glycogenesis. *Eur. J. Biochem.* 31 : 156 - 165.
- 4- FULDER S.J. and TARRANT G.M. 1975. Possible changes in gene activity during the ageing of human fibroblasts. *Exp. Geront.* 10 : 205 - 211.
- 5- GOLDSTEIN S. and MODERMAN E.J. 1975. Heat labile enzymes in Werner's syndrome fibroblasts. *Nature.* 255 : 159.
- 6- HAYFLICK L. and MOORHEAD P.S. 1961 The serial cultivation of human diploid cell strains *Exp. Cell Res.* 25 : 585 - 621.
- 7- HAYFLICK L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37 : 614 - 636.
- 8- HAYFLICK L. 1966. Cell culture and the aging phenomenon In *Topics in the biology of aging*. R.L. Krohn. Interscience publish N.Y London, Sydney 83 - 101.
- 9- HAYFLICK L. 1974. The longevity of culture human cells. *J. Am. Geriatrics soc.* 12 : 1 - 12.
- 10- HAYFLICK L. 1975. Current theories of biological aging *Fed. Proc.* 34 : 9 - 15.
- 11- HERS H.G. 1963. α -glucosidase deficiency in generalized glycogen - storage disease (Pompe's disease). *J. Biochem J.* 86 : 11 - 16
- 12- HOLLIDAY R. and TARRANT G.M. 1972. Altered enzymes in ageing human fibroblasts. *Nature* 232 : 26 - 30.
- 13- HOLLIDAY R. 1975. Testing the protein error theory of ageing : a replay to Baird, Samis, Massie and Zimmerman. *Gerontologia* 21 : 64 - 68.

- 14- HOLLIDAY R. 1975. Growth and death of diploid and transformed human fibroblasts. Fed. Proc. 34 : 51 - 55.
- 15- LEJEUNE N., THINES -SEMPoux D. and HERS H.G. 1967. Tissue fractionation studies. Intracellular distribution and properties of α -glucosidase in rat-liver. Biochem J. 86 : 16 - 21.
- 16- MACIEIRA-COELHO A. 1974. Are non dividing cells present in ageing cell cultures ? Nature. 248 : 421 - 422.
- 17- ORGEL L.E. 1973. Ageing of clones of mammalian cells. Nature. 243 : 441 - 444.
- 18- PACKER L. and SMITH J.R. 1974. Extension of the lifespan of cultured normal human diploid cells by vitamin E. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71 : 4763 - 4767.
- 19- RAPPAPORT C. and BISHOP C.B. 1960. Improved method for treating glass to produce surfaces suitable for the growth of certain mammalian cells in synthetic medium. Exp. Cell. Res. 20 : 580-584.
- 20- RAPPAPORT C., POOLE J.P. and RAPPAPORT H.P. 1960 - Studies on properties of surfaces required for growth on mammalian cells in synthetic medium. Exp. Cell. Res. 20 : 465 - 510.
- 21- ROBINSON D. and STIRLING J.L. 1968. N- Acetyl - β - glucosaminidase in human spleen. Biochem J. 107 : 321 - 327.
- 22- RYAN J.M., DUDA G. and CRISTOFALO V.J. 1974, Error accumulation and aging in human diploid cells. J. Geront. 29 : 616-621.
- 23 -SAHAI SRIVASTAVA B.I. 1973. Changes in enzymic activity during cultivation of human cells in vitro. Exp. Cell. Res 80 : 305 -312.
- 24- STANLEY J.F., PYE D. and MAC GREGOR A. 1975. Comparison of doubling numbers attained by cultured animal cells with life span of species. Nature. 255 : 158 - 159.
- 25- SUN A.S., AGGARWAL B.B. and PACKER L. 1975. Enzyme levels of normal human cells : aging in culture. Arch. Biochem. ^{Biophys} 170 : 1 - 11.
- 26- TULKENS P., BEAUFAY H. and TROUET H. 1974. Analytical fractionation of homogenates from cultured rat embryo fibroblasts. J. Cell Biol. 63 : 383 - 401.

- 27- TURK B. and MILO G.E. 1974. An in vitro study of senescent events of human embryonic lung (W I 38) cells. Arch Biochem and Biophys 161 : 46 - 53.
- 28 - VAN HOOFF F. 1972. Les mucopolysaccharides en tant que thé-
saurismoses lysosomiales. Vander Louvain. (Belgique).
- 29- WANG K.M., ROSE N.R., BARTHOLOMEW E.A. , BALZER M.,
BERDE K. and FOLDVARY M. 1970. Changes of enzymic activi-
ties in human diploid cell line W I 38 at various passages.
Exp. Cell. Res. 61 : 357 - 364.
- 30- WERRIES E., NEUE I. and BUDECKE E. 1975. Evidence for dif-
ferent glycohydrolase and glycosyltransférase activities of
N- Acetyl - β - glucosaminidase A and B. Hoppe Seyler's Z.
Physiol. Chem. 356 : 953 - 960.

BUMP



0 0 3 4 1 0 9 8 4

*FM B04/1976/05

